

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-330300

(43) 公開日 平成4年(1992)11月18日

(51) Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 Q 1/68

A 8114-4B

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全 3 頁)

(21) 出願番号 特願平3-95862

(22) 出願日 平成3年(1991)4月25日

(71) 出願人 000005887

三井石油化学工業株式会社

東京都千代田区霞が関三丁目2番5号

(72) 発明者 宮越 照一

千葉県袖ヶ浦市長浦字拓二号580番32三井

石油化学工業株式会社内

(72) 発明者 幾田 由里子

千葉県袖ヶ浦市長浦字拓二号580番32三井

石油化学工業株式会社内

(74) 代理人 弁理士 遠山 勉 (外2名)

(54) 【発明の名称】 核酸を膜に固定する方法

(57) 【要約】

【目的】 長鎖の核酸のみならず、短鎖の核酸を効率よく膜に固定する。

【構成】 ハイブリダイゼーション用ポリアミド系樹脂膜に核酸を付着させ、80℃より高く、150℃より低い温度で加熱処理する。

【効果】 短鎖長の核酸を効率よく膜に固定できるので、予め短鎖長のハイブリダイゼーション用プローブを膜に固定したものを用意することが可能となり、ハイブリダイゼーションの操作が簡便となる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ポリアミド系合成樹脂を成分として含む膜に核酸を固定する方法において、核酸を前記膜に付着させ80℃より高く150℃より低い温度で加熱処理することを特徴とする核酸を膜に固定する方法。

【請求項2】 加熱処理時間が1時間以上10時間以内であることを特徴とする請求項1に記載の核酸を膜に固定する方法。

【請求項3】 請求項1又は2に記載の方法により核酸を固定したポリアミド系合成樹脂を成分として含む膜。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は核酸をポリアミド系合成樹脂を成分として含む膜に固定する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来、核酸類はいわゆるコロニーハイブリダイゼーション法、ドットハイブリダイゼーション法、サザンハイブリダイゼーション法、ノーザンハイブリダイゼーション法などの手法により他の核酸との塩基配列の相同性が調べられている。これらの手法においては、調べる対象である核酸（以下、検体という。）を変性後、ニトロセルロース、ナイロンあるいはポリフッ化ビニリデンからなる膜などに固定し、これらの膜に固定された核酸に対してプローブと呼ばれる核酸が水素結合するか否かによって、プローブと同じ配列あるいは相補的な配列を有する核酸が存在するか否かを調べている。

【0003】 詳しくは、一本鎖化したプローブと膜に固定された検体が水素結合により二本鎖化、すなわちハイブリダイズし、プローブが検体と共に膜に保持されれば、検体にはプローブと相補的な配列を有する核酸を含むと判断される。又、プローブとハイブリダイズした核酸が変性前に二本鎖であった場合は、このハイブリダイズした鎖と二本鎖化していた他方の鎖はプローブと同じ配列を有すると判断される。

【0004】 これらの方法に於いては、検査手順として検体である遺伝子等の核酸を所定量得て、それらを膜に固定し、そうした上でプローブをその膜に固定された核酸にハイブリダイズさせることが一般的には行われている。

【0005】 しかしこの手順で検査を行う場合には、検査の都度あるいは検査対象毎に、対象とする核酸を膜に固定することが必要であり、操作が煩雑である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 一方、プローブを膜に予め固定しておけば、検査者はハイブリダイゼーションの操作のみを行えば良くなり操作の簡便性が達成される。

【0007】 しかしこの方法は、通常プローブとして使用される核酸が短鎖であるために、従来核酸の膜への固定に行われている80℃程度の加熱処理、あるいは紫外

線処理を行っても膜などに固定しにくいために、実現が困難であった。改良法としてハイブリダイズ反応に関与しない塩基配列をプローブに結合させることにより鎖長を長くし、膜に吸着しやすくする方法が取られている。しかし、このような方法においては酵素反応、あるいは化学合成法による伸長反応が用いられるが、操作的にも、時間的にも、経費的にも必ずしも最上の方法とは言い難い。

【0008】 また、加熱などによる固定方法では固定が不完全であり、1000塩基長程度に伸張したとしても30～40%程度の核酸が固定されるにすぎず、さらに短い核酸にあってはほとんど固定されない。

【0009】 本発明は、このような従来法の欠点を解消するために、長い鎖長の核酸のみならず短い鎖長の核酸であっても膜に効率よく固定する方法を提供しようとするものである。

【0010】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、80℃を越える温度で加熱処理することにより、核酸を膜に強固に結合できることを見だし、本発明に至った。

【0011】 すなわち本発明は、ポリアミド系合成樹脂を成分として含む膜に核酸を固定する方法において、核酸を前記膜に付着させ80℃より高く150℃より低い温度で加熱処理することを特徴とする核酸を膜に固定する方法及びこの方法により核酸を固定した膜に関するものである。

【0012】 以下、本発明を詳細に説明する。本発明により核酸を膜に固定するには、核酸を膜に付着させ、80℃より高く150℃より低い温度でこの膜を加熱処理することにより行う。

【0013】 この方法に使用する膜は、ポリアミド系合成樹脂を成分として含む膜が好ましく、ハイブリダイゼーション用ナイロンメンブレンとして市販されているものを使用することができる。例えば、Photogen膜（BRL社製）、Hybond N膜（Amersham社製）を挙げることができる。

【0014】 膜に固定する核酸は、本発明により核酸を固定した膜をハイブリダイゼーションに使用することを前提とした場合には、10ないし10000塩基長程度のものを使用するのが望ましく、好ましくは10ないし2000塩基長のものを使用する。

【0015】 核酸を溶解する溶液としては水素イオン濃度を制御できる緩衝液が好んで用いられ、さらに食塩を含む緩衝液が用いられる。これら緩衝液としてはSSC（食塩、クエン酸ナトリウムを含む水溶液）、SSPE（食塩、EDTA、リン酸ナトリウムを含む水溶液）、STE（Tris-HCl、食塩、EDTAを含む水溶液）、TE（Tris-HCl、EDTAを含む水溶液）などの緩衝液を例示することができる。

【0016】核酸を膜に付着させる方法は、フィルター状の膜を用い、ピペット又はピペット様の器具を使用して核酸溶液を膜に滴下し浸み込ませる方法、ピペット又はピペット様の器具の先端を膜に接して緩やかに液を押し出し膜に浸み込ませる方法あるいは市販されているプロットング器具を使用する方法が採用される。

【0017】以上のようにして核酸溶液を浸み込ませた膜は風乾した後に加熱処理される。湿ったままで加熱処理を行っても、加熱処理の段階で湿った膜は風乾されるので、必ずしも予め風乾させる必要はない。

【0018】湿った状態で加熱処理する場合は、真空ポンプにつないだデシケータ等を用いて一旦減圧下に膜を置き、加熱処理して風乾させ、その後に80℃より高く、150℃より低い温度で加熱処理することにより全体の処理時間を短縮することができる。しかし、この操作は核酸の固定の効率にはあまり影響しないので、湿った膜を直接80℃より高く、150℃より低い温度で加熱処理することも可能である。

【0019】加熱処理は、温度制御装置が付属した加熱機器、例えば乾燥機、乾熱機あるいは減圧乾燥機を用いて行われる。加熱処理にあたっては、加熱装置の加熱部温度が室温である時に膜を入れ、その後に所定の加熱温度に設定する方法、あるいは予め所定温度に設定しておいた加熱機に膜を入れ、所定時間加熱する方法のいずれも採用される。

【0020】加熱処理は80℃より高く、150℃より低い温度で行われ、100℃～140℃で処理するのが好ましい。加熱時間は、加熱温度によって変えられ、温度を高くするにしたがって短時間で固定され、1分以上10時間以内、好ましくは1時間以上7時間以内、より好ましくは1時間以上4時間以内の範囲に設定される。

【0021】また、加熱処理は加圧下で行ってもよい。加圧下の加熱処理はオートクレーブを使用することにより行うことができる。この場合の温度は120℃、圧力は1.1kg/cm²である。なお加圧下の加熱処理は真空パックした容器を用いて行ってもよい。この方法は特に空気中において加熱した場合に発火燃焼するおそれのある膜を使用する場合に有用な方法である。

【0022】本発明の方法により核酸を固定した膜、特にプローブを予め固定した膜を用意しておくことにより簡便なハイブリダイゼーションの操作が可能になる。

【0023】

【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。

【0024】

【実施例1】まず、d(T)_{12~18} 0.1μgの5'側OHの³²Pラベルを、酵素にT4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造製)、ラベル下剤にγ-ATP(NEN Research Products社製)を用いて、Maniatisらの方法(Maniatisら、Mo 50

lecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1982年、396～397頁)に従い、行った。

【0025】このようにして得られた³²P-d(T)_{12~18}を20μlの6×SSC緩衝液(pH7.0)に溶解し、その内1μlをナイロン膜(BRL社製、Photogene膜)に滴下した。この時のスポットは直径約8mmのほぼ円形を呈していた。

10 【0026】この膜を130℃に温度を設定したオープン中にいれ、常圧下、空気中で2時間加熱処理した。加熱処理後、1mlの6×SSC、0.5%SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)、5×デンハルト液(フィコール、ポリビニルピロリドン、ウシ血清アルブミン各々0.1w/v%)、ニシン精子変性DNA100μgの各成分を含む溶液1mlに入れ、37℃で30分間振盪しながら加熱処理をした。この操作は、通常の核酸のハイブリダイゼーションあるいはハイブリダイゼーションの前に行う、いわゆるプレハイブリダイゼーションの条件に相当する。

20 【0027】上記処理後の膜の放射活性をアロカ社製β(γ)サーベイメータ(TGS-136型)を用いて測定した。その結果、滴下した放射活性4000cpmに対し、膜に残存する放射活性は1600cpmであり、滴下した核酸の内40%が膜に保持されていることがわかった。

【0028】

【実施例2】実施例1においてオープン中での加熱処理を110℃とした以外は実施例1と同様に処理した。

30 【0029】その結果、膜に滴下した放射活性の内37%が膜に保持されていた。

【0030】

【比較例1】実施例1においてオープン中での加熱処理を80℃とした以外は実施例1と同様に処理した。

【0031】その結果、滴下した放射活性の内3%が膜に保持されていた。

【0032】

【比較例2】実施例1においてオープン中での加熱処理を150℃とした以外は実施例1と同様に処理した。

40 【0033】その結果膜に滴下した放射活性の内0.1%が膜に保持されていた。以上の結果から、加熱処理を80℃より高く、150℃より低い温度で行うことにより、従来行われていた80℃での加熱処理に比較して、核酸をより確実に膜に固定できることが明かである。

【0034】

【発明の効果】本発明により、短鎖長の核酸を膜に効率よく固定することができるだけでなく、ハイブリダイゼーション操作の条件下での膜からの剥離を減少させることが可能となる。

file copy

End of Result Set



Generate Collection

L5: Entry 4 of 4

File: JPAB

Nov 18, 1992

PUB-NO: JP404330300A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 04330300 A

TITLE: METHOD FOR IMMOBILIZING NUCLEIC ACID TO MEMBRANE

PUBN-DATE: November 18, 1992

INVENTOR-INFORMATION:

NAME

COUNTRY

MIYAKOSHI, TERUICHI

IKUTA, YURIKO

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME

COUNTRY

MITSUI PETROCHEM IND LTD

APPL-NO: JP03095862

APPL-DATE: April 25, 1991

US-CL-CURRENT: 435/6

INT-CL (IPC): C12Q 1/68

ABSTRACT:

PURPOSE: To efficiently immobilize not only a long-chain nucleic acid but also a short-chain nucleic acid to a membrane.

CONSTITUTION: A nucleic acid is stuck to a membrane of polyamide-based resin for hybridization and heat-treated at $\geq 80^{\circ}\text{C}$ to $\leq 150^{\circ}\text{C}$. Since the short-chain nucleic acid is efficiently immobilized to the membrane, a short-chain probe for hybridization immobilized to a membrane can previously be prepared, thus simplifies operation of hybridization.

COPYRIGHT: (C)1992, JPO&Japio

End of Result Set

Generate Collection

L5: Entry 4 of 4

File: JPAB

Nov 18, 1992

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 04330300 A

TITLE: METHOD FOR IMMOBILIZING NUCLEIC ACID TO MEMBRANEAbstract (1):

PURPOSE: To efficiently immobilize not only a long-chain nucleic acid but also a short-chain nucleic acid to a membrane.

Abstract (2):

CONSTITUTION: A nucleic acid is stuck to a membrane of polyamide-based resin for hybridization and heat-treated at $\geq 80^{\circ}\text{C}$ to $\leq 150^{\circ}\text{C}$. Since the short-chain nucleic acid is efficiently immobilized to the membrane, a short-chain probe for hybridization immobilized to a membrane can previously be prepared, thus simplifies operation of hybridization.